



ESTADO ACTUAL DE LA SELECCIÓN DE SEXO EN LA ESPECIE PORCINA

J.M. Vázquez, E.A. Martínez, I. Parrilla, J. Roca, X. Lucas, C. Cuello, M.A. Gil

Departamento de Medicina y Cirugía Animal (Reproducción y Obstetricia)
Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia

RESUMEN

En el caso del ganado porcino, la técnica tiene su objetivo en las granjas de selección y de machos, granjas de reproducción o venta de material sexado.

La tecnología se basa en diferenciar los espermatozoides con cromosoma X y los que portan cromosoma Y. La metodología de las diferentes técnicas está basada en la diferencia de peso molecular entre el ADN con cromosoma X, que es superior al Y (en el caso de porcino 3,8 veces superior).

El inconveniente es que la excesiva manipulación y presión a las que se someten los espermatozoides altera su funcionalidad y disminuye considerablemente su viabilidad.

En el artículo se detallan las aplicaciones de estos espermatozoides seleccionados, como son la producción de embriones in vivo o in vitro, y se aclaran las ventajas e inconvenientes de cada procedimiento.

En conclusión, la rentabilidad de la técnica, y, por tanto, de su aplicación, mejorará cuando se incremente la velocidad de *sorting* (selección de espermatozoides), se eleve la viabilidad de los espermatozoides, se tenga la posibilidad de someterlos a congelación, pueda mejorarse la producción in vitro de embriones y simplificarse los procedimientos de transferencia, e incrementarse, finalmente, la tasa de partos.

ABSTRACT

In the case of pigs, the technique has its objective in the selection and males farms, reproduction farms or sale of sexed material.

The technology is based on differentiating between spermatozoons with chromosome X and the ones that carry chromosome Y. The methodology of the different techniques is based on the difference in molecular weight between ADN with chromosome X and ADN with chromosome Y, being the first higher to the second (in pigs, 3'8 times higher).

The trouble is that the spermatozoons are subjected to an excessive manipulation and pressure what change their functionality and decrease their viability considerably.

In the article, the applications of these selected spermatozoons are detailed, like the production of embryos in vivo or in vitro, and the advantages and disadvantages of each method are clarified.

Finally, the profitability of the technique, and so of its application, will improve when the sorting velocity (selection of spermatozoons) increase, the viability of the spermatozoons raise, we have the possibility to subject them to freezing, the production of embryos in vitro improve, the transfer methods simplify and, finally, the birthrate increase.



INTRODUCCIÓN

La posibilidad de seleccionar las poblaciones de espermatozoides X e Y y de este modo elegir el sexo de la progenie ha abierto un nuevo camino en la producción animal.

Actualmente, esta técnica tiene un especial interés cuando se dirige a grupos de elevado valor económico y/o genético ya que esta técnica permitiría la planificación para que el sexo de los lechones coincidiera con el sexo deseado. Además, esta técnica sería de gran interés en combinación con otras como la transferencia no quirúrgica de embriones que permitiría la comercialización de embriones de sexo conocido y, por consiguiente, su introducción en las granjas de un modo seguro.

Hasta el momento, la única técnica de separación que ha podido ser reproducida en diferentes laboratorios ha sido la separación mediante citometría de flujo. Esta técnica se basa en la diferente fluorescencia que emiten los espermatozoides tras la tinción del ADN, diferencia que a su vez se basa en la diferente cantidad de ADN que existe entre el cromosoma X y el cromosoma Y (Pinkel et al., 1982; Seidel y Johnson, 1999; Vázquez et al., 2001c; Vázquez et al., 2002b).

Estas diferencias no son iguales en todas las especies, siendo de un 7,5% en el caso de las chinchillas y de, sólo, un 2,8% en el caso de los espermatozoides humanos. Las especies de interés productivo se encuentran entre estos límites siendo de un 3,6% en el caso del verraco, 3,7% para caballos, 3,8% para toros y 4,2% para moruecos (Welch y Johnson, 1999). A medida que esta diferencia es mayor, la separación de los espermatozoides X e Y se ejecuta con mayor facilidad (Parrilla et al., 2004).

Durante los últimos 5 años se han realizado importantes avances en el desarrollo de esta técnica relacionados con el conocimiento de la fisiología del espermatozoide separado, evaluación de la mutagenicidad del procedimiento, incremento en el rendimiento de separación, mejora de los medios de recogida que aumentan la viabilidad y supervivencia del espermatozoide, ampliación de la resolución de espermatozoides X e Y, etc. (Centurión et al., 2000, 2003; Johnson et al., 1999; Maxwell et al., 1997; Parrilla et al., 2001a; Rens et al., 1998; Vázquez et al., 2002c).

METODOLOGÍA DE SEPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES X E Y MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

A diferencia de otros procesos en los que están implicadas las técnicas de citometría de flujo, cuando se trabaja en separación de espermatozoides, este procedimiento complejo tiene siempre como doble objetivo el obtener espermatozoides separados en poblaciones X e Y pero, al mismo tiempo, espermatozoides que deben ser viables para asegurar una fecundación in vitro o, preferentemente, in vivo.

El procedimiento de separación de espermatozoides X e Y mediante citometría de flujo puede dividirse en tres diferentes fases:

1. Preparación y tinción de la muestra.
2. Análisis de la muestra y discriminación de las poblaciones de espermatozoides X e Y.
3. Separación de los espermatozoides X e Y. Rendimientos.

Fase 1: Preparación y tinción de la muestra

Tras la obtención de los eyaculados, los espermatozoides deben ser diluidos en un medio que les asegure la viabilidad hasta el momento de la separación. Estos espermatozoides diluidos deben ser incubados durante 1 hora a 35°C con una solución de Hoechst 33342 (H-42). Este fluorocromo tiene como característica que se superpone a la doble hélice de ADN, de modo que emite más o menos fluorescencia en función de la cantidad de ADN presente (Johnson y Schulman, 1994). Uno de los aspectos más importantes en este proceso es conseguir la estabilidad de la tinción ya que si el tiempo o temperatura de tinción no es la adecuada, las diferencias observadas posteriormente al citómetro de flujo son más debidas a, por ejemplo, la presencia de espermatozoides muertos (el H-42 penetra más fácilmente) que a una verdadera diferencia entre espermatozoides X y espermatozoides Y. Tras la incubación es importante verificar al microscopio que la tinción se ha producido, así como que la motilidad de los espermatozoides sigue siendo similar a la que presentaban antes de la incubación (Vázquez et al., 2002d).

La principal preocupación en la utilización de este procedimiento, y ya que aunque el H-42 no se intercala, sino que se superpone al ADN, era el potencial efecto mutagénico que este fluorocromo podía ejercer sobre los espermatozoides. Si bien no existen evidencias de mutagenicidad en aspectos fenotípicos de los



animales nacidos mediante este procedimiento, hemos evaluado el efecto mutagénico mediante técnicas de roturas cromosómicas (Breaks) e intercambio de cromátidas hermanas (Sister Chromatide Exchanges). Los resultados indicaron que ni en la primera ni en la segunda generación de animales nacidos mediante espermatozoides teñidos con H-42 no se presentaban evidencias de mutagenicidad (Parrilla et al., 2003b). Se han obtenido estos mismos resultados en animales nacidos tras la tinción de los espermatozoides y el impacto del láser de ultravioleta (Parrilla et al., 2003b).

Fase 2: Análisis de la muestra y discriminación de las poblaciones de espermatozoides X e Y

Tras la tinción de los espermatozoides, se procede al análisis para intentar discriminar dos poblaciones en base a la cantidad de ADN que presenten. Este procedimiento no fue posible hasta que en 1982, Pinkel et al., demostraron que esta diferenciación era posible en núcleos de espermatozoides de ratón utilizando un equipo denominado citómetro de flujo. Posteriormente, Garner et al. (1983) realizaron este mismo experimento utilizando espermatozoides de especies domésticas. En 1989, Johnson et al. obtuvieron los primeros nacimientos en conejos utilizando esta tecnología.

El citómetro de flujo es un equipo altamente sofisticado, cuya función es la de medir células, que pueden ser analizadas en base a sus características físicas (tamaño, complejidad celular) o en base a la fluorescencia que emiten tras ser marcadas con un fluorocromo "per se" o unido a otra partícula (anticuerpo, lectina, neoglucoconjugado, etc.).

Los componentes básicos de un citómetro van a ser el circuito de admisión de la muestra, el haz de luz láser que excitará el fluorocromo, la cámara de flujo o lugar de encuentro entre la célula y el láser, y el bloque óptico cuyo objetivo es el de recoger la fluorescencia emitida por la célula, y de este modo poder cuantificar esa emisión. Los resultados obtenidos de fluorescencia quedan reflejados en una pantalla en la cual, mediante diferentes programas, se representan en forma de poblaciones las células analizadas (Vázquez et al., 2002a).

El mayor obstáculo que se presenta en la separación de espermatozoides, además de la pequeña diferencia que existe entre el cromosoma X e Y, es la morfología espermática. Los espermatozoides son células planas que van a emitir una fluorescencia diferen-

te en función de la posición por la que pasen a través de la cámara de flujo. Esto hace que el diferente grado de fluorescencia que el espermatozoide emite en función de la posición por la que pase a través del citómetro sea mayor que la diferencia de fluorescencia que el espermatozoide emite en función de que transporte un cromosoma X o un cromosoma Y. Por tanto, es necesario hacer un primer análisis de posición del espermatozoide para, simultáneamente y sólo en los espermatozoides que pasan en una posición determinada a través de la cámara de flujo, analizar la cantidad de ADN de su interior y de este modo poder diferenciar espermatozoides X e Y. Este doble análisis obliga a modificar los citómetros convencionales, siendo necesario instalarles un fotomultiplicador frontal capaz de recoger fluorescencia. El fotomultiplicador convencional (90°) servirá para discriminar entre espermatozoides orientados/no-orientados, mientras que el fototubo frontal (0°) servirá para discriminar entre poblaciones de espermatozoides X e Y. Aunque de este modo es posible discriminar entre espermatozoides X e Y de poblaciones orientadas, el porcentaje de espermatozoides orientados utilizando sistemas de citometría convencionales no alcanza el 10%. Por este motivo, es necesario incorporar sistemas que permitan incrementar el porcentaje de espermatozoides orientados que pasan por la cámara de flujo. Hasta el momento se han descrito dos procedimientos. El primero se basa en la utilización de una aguja biselada que incrementa estos porcentajes hasta el 30%, mientras que el segundo se basa en la instalación de una cámara de flujo helicoidal que puede llegar a incrementar el porcentaje de espermatozoides orientados hasta el 70%. Este incremento en el número de espermatozoides orientados hace que el rendimiento del proceso de separación aumente considerablemente. Esta tecnología se conoce como Beltsville Sexing Technology (Johnson et al., 1999; Johnson et al., 2004).

En nuestro caso, nosotros desarrollamos la aplicación con el citómetro ALTRA de Coulter Co (Miami, FL), equipado con un hypersort y un láser Innova 90-6 emitiendo en ultravioleta. Además, presenta un fotomultiplicador frontal y aguja biselada.

Los resultados tras el análisis quedan reflejados, tras la selección de espermatozoides orientados, en un histograma donde aparece, a la izquierda la población menos fluorescente, es decir, aquella que corresponde a espermatozoides Y y, a la derecha, una población más fluorescente que corresponde a espermatozoides X. Entre ambas, queda una hendidura que las separa. En función de que esta hendidura sea más o menos pronunciada, se podrá seleccionar para separar una población más o menos grande. Los resultados con



hendiduras pequeñas obligan a seleccionar una población pequeña ya que gran parte de la población quedará ubicada en la denominada "zona de confusión", es decir, un área común compartida entre espermatozoides X y espermatozoides Y. Estas poblaciones pueden también discriminarse desde el diagrama de densidades (figura 1).

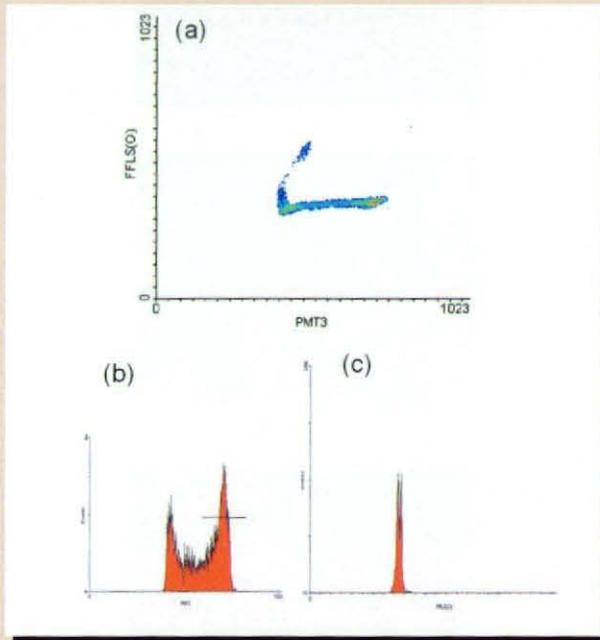


Figura 1. Separación de espermatozoides de verraco en función de la presencia de un cromosoma X o Y. (a). Diagrama de densidades donde se muestran en color rojo las poblaciones de espermatozoides X (arriba) y espermatozoides Y (abajo); (b) Histograma representando los espermatozoides orientados y, consecuentemente, susceptibles de ser analizados y (c) histograma de los espermatozoides orientados donde se observan dos poblaciones que corresponden a espermatozoides Y (pico de la derecha) y espermatozoides X (pico de la izquierda).

Fase 3: Separación de los espermatozoides X e Y. Rendimientos

Tras la selección de los espermatozoides, se realiza el proceso de separación. Básicamente, el citómetro de flujo envuelve a cada célula con una pequeña gota de medio. Este medio que envuelve al espermatozoide está constituido, comúnmente, por PBS, EDTA y el 1% de albúmina sérica bovina. Estas microgotas son cargadas eléctricamente en superficie en caso de transportar el espermatozoide seleccionado. Finalmente, estas gotas pasan a través de las placas deflectoras. Estas placas están cargadas con alto voltaje, de tal modo que atraen a las microgotas

que presentaban carga superficial. De este modo, se genera un chorro lateral, desviado desde el chorro central o chorro de desecho, que puede ser recogido en un tubo diferente. En este tubo se recogerá la población seleccionada, es decir, la que contiene los espermatozoides X o Y. Los tubos en los que se recogen los espermatozoides separados incluyen un medio que estabiliza y amortigua a los espermatozoides tras su paso por el citómetro de flujo. Hay que tener en cuenta que las microgotas impactan sobre la superficie del tubo a más de 100 km/h. Este medio está compuesto por una solución de TRIS-TEST más yema de huevo en una concentración que va desde el 2% al 20% final y plasma seminal (desde el 1% al 10%) o fracciones proteicas del plasma seminal. Sobre estos tubos se suele recoger 9 veces el volumen del medio de recogida depositado.

La velocidad de separación va a depender, entre otras cosas, de la presión a la que se haga pasar la muestra a través del analizador. Aunque la presión normal de trabajo es de 12 p.s.i., los nuevos sistemas de separación van equipados con los módulos "hypersort" que permiten incrementar esta presión hasta 100 p.s.i. Hasta el momento, se ha comprobado cómo presiones de trabajo de hasta 62 p.s.i. (6 veces por encima de los normal) no afectan ni a la viabilidad (Parrilla et al. 2001a) ni a la fertilidad de la célula espermática (datos no publicados).

Hasta el momento se han conseguido realizar separaciones con unos rendimientos cercanos a 7 millones de espermatozoides/hora y una pureza alrededor del 90% (Rens et al., 1999; Vázquez et al., 2001c). Esta combinación entre el rendimiento y la pureza siempre está equilibrada en los sistemas de separación. Incrementos en el rendimiento van en detrimento de la pureza, y viceversa.

EVALUACIÓN DE LA PUREZA DE LA SEPARACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES

Uno de los aspectos más importantes en este procedimiento es conocer "a priori", la pureza de las poblaciones separadas. Aunque el método definitivo es conocer el sexo de la descendencia, éste es un procedimiento tardío y, en cualquier caso, extremadamente costoso. Por eso es necesario, tras el análisis bajo unas determinadas condiciones, conocer el porcentaje de pureza de la población. Hasta hace muy poco tiempo, el único sistema de análisis utilizado era la reevaluación de las muestras por citometría (Johnson, 2000). Las muestras una vez obtenidas eran de nuevo teñidas y sometidas a un nuevo examen. La población seleccionada (X o Y) era la única que debía estar presente en el área de separación. Sin embargo, éste es un método de evaluación que utiliza la misma instrumentación (citómetro)



que la utilizada para la obtención de la muestra. Por esto se recomienda utilizar metodologías alternativas para la evaluación de la muestra. Entre ellas se encuentran sistemas PCR a partir de una célula o de estudios semicuantitativos. Frente a estos métodos, recientemente, se ha descrito una metodología basada en hibridación "in situ" que permite verificar la pureza de las poblaciones basándose en la inclusión de sondas específicas de cromosoma porcino X o cromosoma porcino Y marcadas con fluorescencia en extensiones sobre portaobjetos (Karawasaki et al., 1998; Parrilla et al., 2002; Parrilla et al., 2003a) (figura 2). Este procedimiento de fácil lectura ya que se realiza bajo el microscopio de fluorescencia, tiene como inconveniente que no es un procedimiento comercial y, por tanto, es necesario construir las sondas fluorescentes tras la realización de una PCR sobre el ADN espermático y posterior marcaje con el conjugado fluorescente. Este procedimiento permite la evaluación y elección de la combinación requerida en cada momento de rendimiento y pureza (Welch y Johnson, 1999).

VIABILIDAD Y LONGEVIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES SEPARADOS

Como se comentaba anteriormente, el objeto final de esta metodología no es solamente la obtención de espermatozoides separados para el sexo deseado, sino que también, es necesario que estos espermatozoides mantengan la viabilidad y la capacidad fecundante durante el tiempo necesario requerido entre su obtención y su utilización ya sea in vivo o in vitro. Inicialmente, aunque la separación era posible, todos los espermatozoides obtenidos estaban muertos, es decir, inutilizables para el fin que se pretendía. Tras la mejora del procedimiento de selección, así como de los medios de recogida, la supervivencia de los espermatozoides separados ha aumentado notablemente. Cuando se aplican las técnicas de viabilidad (Centurion et al., 2000), triple tinción fluorescente (datos no publicados), análisis computerizados de motilidad (Parrilla et al., 2001a) o clortetraciclina (Maxwell y Johnson, 1997) se ha observado que los espermatozoides separados mediante citometría de flujo, en las condiciones y con los medios actuales, son células inestables, en un estado de capacitación o precapitación debido al estrés del procedimiento y, sobre todo, a la alta dilución a la que se ven sometidos. Este estado se expresa, principalmente, en un incremento del calcio intracitoplasmático, así como una modificación en los patrones de motilidad. Sin embargo, cuando los medios de recogida contienen plasma seminal o proteínas específicas del plasma seminal (Vázquez et al., 2001a; Centurión et al., 2003), los espermatozoides separados experimentan una reestabilización que les permiten mantener un porcentaje de espermatozoides móviles y viables del 80% a 25°C durante, al menos, 15 horas.

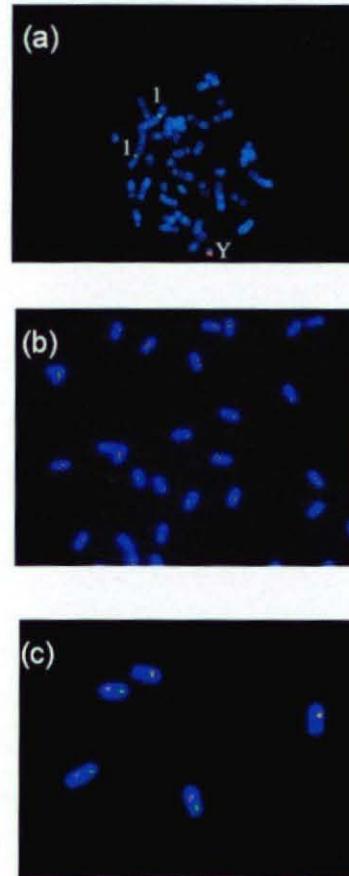


Figura 2. Hibridación "in situ" fluorescente de cromosoma 1 y cromosoma Y. (a) Metafase de linfocitos porcinos mostrando la especificidad de la sonda fluorescente para cromosoma 1 (verde) y para cromosoma Y (rojo). (b) Espermatozoides diluidos donde aproximadamente el 50% se marca con la sonda fluorescente de cromosoma Y y (c) espermatozoide separados para cromosoma Y donde se muestra que el 100% de los espermatozoides presentan cromosoma Y.

APLICACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES SEPARADOS

Uno de los aspectos más importantes es conocer cómo los espermatozoides separados pueden ser utilizados. Se han obtenido nacimientos en conejos, vacuno, porcino, équidos, ovino y humanos a través de la inseminación artificial o fecundación in vitro y posterior transferencia de embriones utilizando espermatozoides separados y/o espermatozoides separados y congelados.



Congelación de espermatozoides separados

Debido al ritmo productivo existente en las explotaciones y rendimientos del sistema de separación, la posibilidad de criopreservar los espermatozoides separados sería de gran importancia en la aplicación práctica de este procedimiento. Esto, sin duda, aumentaría considerablemente los rendimientos del citómetro al tiempo que permitiría desplazar las dosis separadas a larga distancia. Aunque los espermatozoides separados son espermatozoides, inicialmente, débiles, la incorporación a los medios de recogida de plasma seminal o proteínas extraídas desde el plasma seminal, pueden generar una reestabilización de la membrana que los haga aptos para ser sometidos a un proceso de congelación. Las únicas experiencias de congelación realizadas hasta el momento con espermatozoides separados han sido hechas con espermatozoides de toro (Schenk et al., 1999 y Seidel et al., 1999) y verraco (Jonson, 2000; Bathgate et al., 2003). Si bien en el caso del vacuno, la experiencia en el proceso de congelación, la congelabilidad del espermatozoide y la disposición anatómica de los cuernos uterinos de la vaca han permitido el nacimiento de terneros tras inseminación artificial con espermatozoides separados y congelados, en el caso del porcino sólo se han conseguido nacimientos tras la inseminación quirúrgica de las cerdas con espermatozoides de verraco separados y congelados. Sin embargo, los resultados actuales obtenidos en congelación de espermatozoides de verraco (Roca et al., 1999, 2003; Carvajal et al., 2001; Eriksson et al., 2001) y la posibilidad de utilizar sondas de inseminación intrauterina profunda en la cerda (Martínez et al., 2001a, Martínez et al., 2002a) hacen que la posibilidad de combinar tecnologías de sorting/congelación y su aplicación mediante procedimientos no quirúrgicos tenga un futuro esperanzador (Bathgate et al., 2003).

Producción in vitro de embriones

Debido al bajo número de espermatozoides que el citómetro es capaz de separar por unidad de tiempo, una de las posibles vías en la aplicación de los espermatozoides separados es la producción in vitro de embriones, bien a través de técnicas convencionales de fecundación in vitro, bien a través de técnicas de inyección intracitoplasmática y la posterior transferencia de embriones.

Los primeros resultados se obtuvieron en 1993 (Cran et al.) con espermatozoides de toro, los cuales, tras la separación, fueron utilizados en la producción in vitro de embriones con una buena tasa de nacimientos tras la transferencia. En el caso del porcino, los resultados van más retrasados. En 1997 (Rath et al.) y 1998 (Abeydeera et al.) obtuvieron los primeros nacimientos tras

la fecundación in vitro y posterior transferencia quirúrgica en cerdos. Recientemente se han publicado los primeros nacimientos de lechones nacidos mediante la producción de embriones con espermatozoides sexados e inyectados en el citoplasma de los ovocitos (ICSI) (Probst y Rath, 2003).

Uno de los aspectos a tener en cuenta cuando se trabaja con espermatozoides separados y que los diferencia de los espermatozoides frescos utilizados para fecundación in vitro, es el grado de capacitación o precapitación que alcanzan tras la separación. Esto hace que se deban modificar las condiciones de FIV para obtener el máximo rendimiento (Parrilla et al., 2001b). Bajo estas condiciones se pueden obtener resultados similares a los obtenidos con espermatozoides diluidos de hasta un 30% de blastocistos a los siete días tras la fecundación in vitro (Gil, 2001). El principal problema que sigue manteniendo esta tecnología es que, tras la transferencia embrionaria quirúrgica, los resultados no son los deseados. Actualmente, nuevos sistemas de transferencia no quirúrgica en porcino (Martínez et al., 2001b) junto a nuevos avances en la producción in vitro de embriones (Day, 2000) podrían convertir a esta técnica en una técnica de aplicación práctica como sucede en el caso del vacuno.

Inseminaciones quirúrgicas y no quirúrgicas

No cabe duda que el método ideal de utilización de los espermatozoides separados sería una metodología que empleara la inseminación artificial al tiempo que necesitara un bajo número de espermatozoides para conseguir un buen porcentaje de gestaciones.

En el ganado vacuno ésta es una técnica de la que se tiene importante información en cuanto a que son más de 2.000 vacas las inseminadas con semen separado. Los resultados obtenidos con espermatozoides sexados y, posteriormente congelados, muestran que se puede obtener un 50% de gestaciones con una pureza esperada del 85% cuando se inseminan entre un millón y un millón y medio de espermatozoides (Seidel et al., 1999).

En el ganado porcino la situación actual es diferente. Los primeros resultados de gestación se obtuvieron realizando inseminaciones quirúrgicas en oviducto (Johnson, 1991). Aunque este sistema de inseminación es un procedimiento complejo, la simplificación de las inseminaciones utilizando técnicas laparoscópicas abren un nuevo campo de investigación en la obtención de lechones de sexo deseado.

Debido a que las inseminaciones convencionales se realizan con tres mil millones de esper-



matozoides, conseguir esta dosis mediante citometría de flujo requeriría 15 días de trabajo ininterrumpido. Este factor limitante hacía impensable la utilización de espermatozoides mediante una vía que no fuera la quirúrgica. Tras el desarrollo de una sonda de inseminación intrauterina profunda (Vázquez et al., 1999; Martínez et al., 2002b) que permitía alcanzar las proximidades de la unión uterotubárica y depositar aquí los espermatozoides, se empezaron a realizar las primeras inseminaciones con espermatozoides separados mediante citometría de flujo, alcanzándose la primera gestación por vía no quirúrgica utilizando 70 millones de espermatozoides (Vázquez et al., 2003; Vázquez et al., 2004) utilizando protocolos anteriormente establecidos en cerdas con ovulación inducida (Martínez et al., 2001a) u ovulación espontánea (Vázquez et al., 2001b). El porcentaje de fertilidad estimado se sitúa en un 39% con una prolificidad de 8,7 lechones cuando se insemina con 70 millones, mientras que si se inseminan 140 millones de espermatozoides el porcentaje esperado se sitúa en un 46,6% de gestaciones con un tamaño de camada de 9,9 lechones (Vázquez et al., 2003). Posteriormente y utilizando la misma metodología, se ha descrito el nacimiento de lechones hembras en Alemania (Rath et al., 2003).

CONCLUSIONES

La técnica de la selección de sexo en la especie porcina mediante citometría de flujo es una realidad, habiéndose obtenido descendencia tras la producción de embriones in vitro y su posterior transferencia o mediante la inseminación de las cerdas, ya sea mediante técnicas de inseminación intrauterina profunda o mediante inseminaciones quirúrgicas. El principal factor limitante de esta técnica es el elevado costo económico de la separación. Si bien se ha disminuido drásticamente en los últimos años, y esto ha permitido la comercialización de esta tecnología en el ganado vacuno, sigue siendo el precio de producción elevado para su aplicación extensiva en el ganado porcino. Sin embargo, el empleo de esta tecnología en animales de alto valor genético o bajo determinadas condiciones puede ser una realidad en los próximos años.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tecnología en nuestros laboratorios está siendo financiada por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2001-0471), Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) y la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia a través de la Fundación Séneca (PB/74/FS/02) y la Dirección General de Ciencia, Tecnología y Sociedad de la Información (30.476. 2003-2004) así como con la participación de la empresa Dalland Hybrid España, S.A.

BIBLIOGRAFÍA

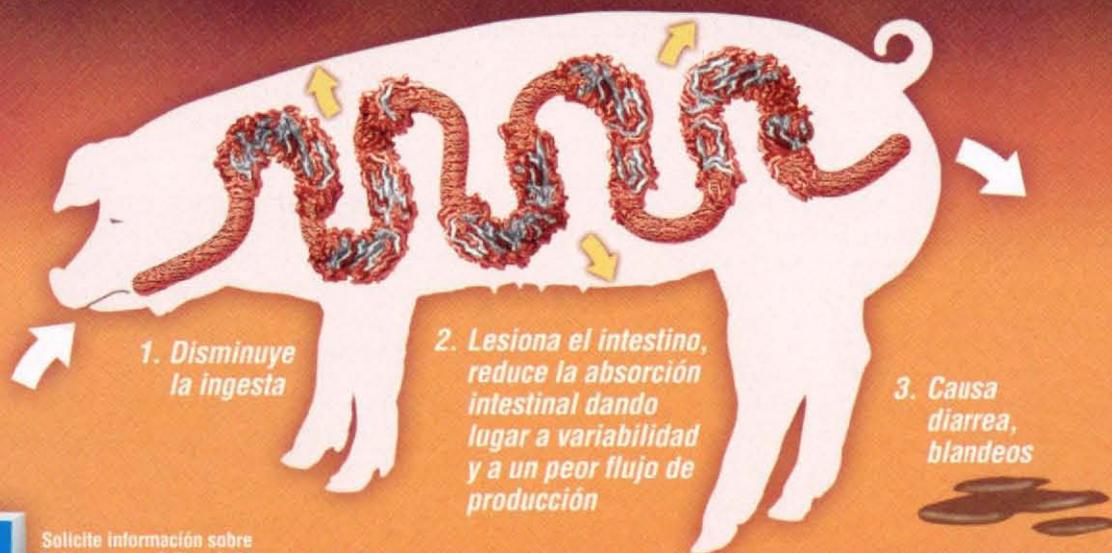
1. Abeydera LR, Johnson LA, Welch GR, Wang WH, Bosquet AC, Cantley TC, Rieke A, Day BN. Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa sorted by high speed flow cytometry. *Theriogenology* 1998; 50: 981-8.
2. Bathgate R, Eriksson B, Maxwell WMC, Evans G. Low dose deep intrauterine insemination of sows with fresh and frozen-thawed spermatozoa. *Vth International Conference on Boar Semen Preservation*, Doorwerth, Netherlands 2003; Abstr p. 49.
3. Carvajal G, Cuello C, Ruiz M, Lucas X, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J. Effect of the centrifugation regimes on the viability y penetrability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology* 2001; 55(1): 302.
4. Centurión F, Vázquez JM, Calvete JJ, Parrilla I, Sanz L, Lucas X, Gil MA, Roca J, Martínez EA. Comparative effects of homologous and heterologous seminal plasma on the motility and viability of cytometer sorted boar sperm. *4th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction* Praga 23-25 Noviembre 2000. pp. 5.
5. Centurión F, Vázquez JM, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, García EM, Martínez EA. Influence of Porcine Spermatheins on the Susceptibility of Boar Spermatozoa to High dilution. *Biology of Reproduction* 2003; 69: 640-6.
6. Cran DG, Johnson LA, Miller NG, Cochrane D, Polge C. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome-bearing sperm and in vitro fertilisation. *Vet Rec* 1993; 132: 40-1.
7. Day BN (2000). Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 161-172.
8. Eriksson BM, Vázquez JM, Martínez E, Roca J, Lucas X, Rodríguez-Martínez H. Effect of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology* (en prensa).
9. Gil MA. Influencia de diferentes condiciones de cocultivo sobre la fecundación y la producción in vitro de embriones porcinos. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, 2001.



ESTADO ACTUAL DE LA SELECCIÓN DE SEXO EN LA ESPECIE PORCINA

- Garner DL, Gledhill BL, Pinkel D, Lake S, Stephenson D, Van Dilla MA, Johnson LA. Quantification of the X and Y chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol Reprod* 1983; 28: 312-71
- Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod* 1989; 41: 199-203.
- Johnson LA. Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination and flow sorted X- and Y- bearing sperm. *Reprod Dom Anim* 1991; 26: 309-14.
- Johnson LA, Schulman JD. The safety of sperm selection by flow cytometry. *Human Reproduction* 1994; 9(5): 757-9.
- Johnson LA, Welch G y Rens W (1999) The Beltsville sperm sexing technology: High-Speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization y *Al. J. Anim. Sci.* Vol: 77.
- Johnson LA. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 93-107.
- Johnson LA, Rath D, Vázquez JM, Maxwell WC, Dobrinsky JR. Preselection of sex in swine for production of offspring: an update on the process and application. *Theriogenology* (en prensa), 2004.
- Karawasaki T, Welch GR, Long CR, Yoshida M y Johnson LA. Verification of flow cytometrically-sorted X- y Y bearing porcine spermatozoa y reanalysis of spermatozoa for DNA content using the fluorescence in situ hybridisation (FISH) technique. *Theriogenology* 1998; 50: 625-35.
- Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vázquez JL, Day BN. Successful non-surgical deep intrauterine insemination with low number of spermatozoa in sows by a fiberoptic endoscope technique. *Reproduction* 2001a; 122: 289-96.
- Martínez EA, Gil MA, Rieke A, McCauley TC, Cantley TC, Vázquez JM, Roca J, Vázquez JL, Didion BA, Day BN. Successful non-surgical deep intrauterine catheterisation in gilts and sows during metaoestrus. 6th International conference on Pig Reproduction Columbia-Missouri, EEUU, 2001b.

Lo que la Ileítis le hace a sus cerdos



Solicite información sobre IleTest, para el diagnóstico de la Ileítis porcina

Diagnosticar a tiempo para mejorar la productividad

AF 0250 TRELACON G 250 Premezcla (Tilosina Fosfato) **Peso Neto: 25 kg. Composición por kg.:** Fosfato de Tilosina equivalente a 250 gr. de actividad de Tilosina. Excipiente c.s.p. 1 kg. **Descripción del producto:** Trelacon G 250 es una premezcla de Tilosina granulada de color amarillento a rojizo, que fluye libremente en el pienso. **Indicaciones:** Cerdos: Trelacon G 100 está indicado para la prevención y el tratamiento de: Neumonía enzootica, causada por *Mycoplasma hyoneumoniae*, rinitis atrofica, disentería porcina, Ileítis (Enteropatía Proliferativa) causada por *Lawsonia intracelularis*, y otros microorganismos sensibles a Tilosina. **Cerdas:** Para mejorar la viabilidad de la camada. **Instrucciones para su administración: Cerdos:** Prevención y control de Neumonía enzootica, Rinitis atrofica y Disentería porcina: 3-6 mg de tilosina /Kg de peso corporal, lo que normalmente se obtiene añadiendo 400 g de Trelacon G 250 por tonelada de pienso, lo que equivale a 100 mg de tilosina por Kg de pienso. Usar como única ración durante 21 días, seguido de pienso que contenga 160 g de Trelacon G 250 por tonelada de pienso, lo que equivale a 40 mg de tilosina por Kg. de pienso mientras dure el periodo de riesgo. Prevención y control de Ileítis (Enteropatía proliferativa): 3-6 mg de tilosina /Kg de peso corporal, lo que normalmente se obtiene añadiendo 400 g de Trelacon G 250 por tonelada de pienso, lo que equivale a 100 mg de tilosina por Kg de pienso. **Cerdas:** Para mejorar la viabilidad de la camada, adminístrense 100 ppm de Tilosina (400 g de Trelacon G 250/Tm de pienso) una semana antes y otra después del parto. **Instrucciones para hacer la mezcla: Importante** Trelacon G 250 debe mezclarse con una cantidad adecuada de pienso (20 - 25 kg.) antes de ser incorporado al volumen final del pienso. **Sobredosisificación:** Tilosina por vía oral tiene un amplio margen de tolerancia en ganado porcino, aves y



20. Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vázquez JL, Day BN. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction* 2002a; 123: 163-70.
21. Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Vázquez JL. Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. *Reproduction* 2002b; (Supplement 58): 301-11.
22. Martínez EA, Caamaño JE, Gil MA, Rieke A, Mccauley TC, Cantley TC, Vázquez JM, Roca J, Vázquez JL, Didion B, Murphy CN, Prather RS, Day DN. Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology* 2004; 61: 137-46.
23. Maxwell WMC, Welch GR, Johnson LA. Viability y Membrane Integrity of spermatozoa after dilution y flow sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 1997; 8: 1165-78.
24. Parrilla I, Vázquez JM, Centurión F, Roca J, Lucas X, Gil MA, Martínez EA. Effect of high-speed flow sorting on sperm motility pattern of boar spermatozoa. *Theriogenology* 2001a; 55 (1): 501.
25. Parrilla I, Vázquez JM, Gil MA, Centurión F, Lucas X, Roca J y Martínez EA. In vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes with sorted and unsorted boar spermatozoa. 5th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction.
26. Parrilla I, Oliver-Bonet M, Sánchez-García JF, Gutiérrez-Mateo C, Vázquez JM, Navarro J, Yelamos J, Roca J, Martínez EA. Fluorescence in situ Hybridization in boar spermatozoa using specific DNA probes labeled by Nick Translation. *Reprod Domest Anim* 2002; 37 (4): 244.
27. Parrilla I, Vázquez JM, Oliver-Bonet M, Navarro J, Yelamos J, Roca J, Martínez EA. Fluorescence In Situ Hybridization in diluted and flow cytometrically sorted boar spermatozoa using specific DNA direct probes labelled by Nick Translation. *Reproduction* 2003a; 126: 317-25.
28. Parrilla I, Vázquez JM, Di Berardino D, Roca J, Martínez EA. Evaluation of mutagenic effect of Hoechst 33342 in pig spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 2003b; 38 (4): 342.
29. Parrilla I, Vázquez JM, Roca J, Martínez E. Flow cytometry identification of X- and Y- chromosome bearing goat spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* (en prensa), 2004.
30. Pinkel D, Gledhill BL, Van Dilla MA, Stephenson D, Watchmaker G. High resolution DNA measurements of mammalian spermatozoa. *Cytometry* 1982; 3: 1-9.
31. Probst S, Rath D. Production of piglets using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flow cytometrically sorted boar semen and artificially activated oocytes. *Theriogenology* 2003; 59: 961-73.
32. Rath D, Johnson LA, Dobrinsky GR, Welch GR, Niemann H. Production of piglets preselected for sex following in vitro fertilization with X y Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology* 1997; 47: 795-800.
33. Rath D, Ruiz S, Sieg B. Birth of female piglets following intrauterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen. *Veterinary Record* 2003; 152: 400-1.
34. Rens W, Welch G, Johnson LA. A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X y Y chromosome-bearing sperm. *Cytometry* 1998; 33: 476-81.
35. Rens W, Welch G, Johnson LA. Improved flow cytometric sorting of X-y Y.chromosome bearing sperm: Substantial increase in yield of sexed sperm. *Molec Reprod Dev* 1999; 52: 50-56.
36. Roca J, Lucas X, Gil MA, Vázquez JM, Carvajal G, Martínez EA. Motility y in vitro penetrating ability of cooled y frozen-thawed spermatozoa from identical boars. IV International Conference on Boar Semen Preservation. Beltsville, Maryly, EEUU. Proceeding 1999. p. 18.
37. Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vázquez JM, Martínez EA. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 2003; 60: 77-87.
38. Schenk JL, Suh TK, Can DG, Seidel JR. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 52: 1357-91.
39. Seidel GE, Johnson LA. Sexing mammalian sperm Overview. *Theriogenology* 1999; 52: 1267-72.
40. Seidel GE, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD, Cran DG. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 1999; 52: 1407-20.
41. Vázquez JL, Martínez EA, Vázquez JM, Lucas X, Gil MA, Parrilla Y, Roca J. Development of a non-surgical deep intrauterine insemination technique IV International Conference on Boar Semen Preservation P35 Beltsville, Maryland EEUU, 1999.
42. Vázquez JM, Calvete JJ, Centurion F, Parrilla I, Sanz L, Lucas X, Gil MA, Roca J, Martínez EA. Effect of porcine



ESTADO ACTUAL DE LA SELECCIÓN DE SEXO EN LA ESPECIE PORCINA

- spermadhesins on the viability and motility of highly diluted boar spermatozoa. *Theriogenology* 2001a; 55(1): 448.
43. Vázquez JM, Martínez EA, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Lucas X, Roca J, Vázquez JL, Didion BA, Day BN. Dep. intrauterine insemination in natural post-weaning Oestrus sows 6th International conference on Pig Reproduction Columbia-Missouri, EEUU 2001b.
 44. Vázquez JM, Martínez EA, Roca J, Lucas X, Parrilla I. Sex-sorting boar sperm: problems and possibilities. *Archiv Für Tierzucht* 2001c; 44: 141-5.
 45. Vázquez JM, Martínez EA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal C, Gil MA, Lucas X, Centurión F, Vázquez JL, Roca J. Deep intrauterine insemination in sows with flow cytometric sorted sperm. *Theriogenology* 2002a; 57(1): 389, 2002.
 46. Vázquez JM, Parrilla I, Roca E, Martínez EA. Sex sorting sperm. 14th Meeting European A.I. Vets. Lugo, 23-25 Octubre, 2002b.
 47. Vázquez JM, Parrilla I, Roca E, Martínez EA. Sex sorting bull and boar sperm. 9th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction. Chennai India 2002c; 2-5 Diciembre, 2002.
 48. Vázquez JM, Martínez EA, Parrilla I, Gil MA, Lucas X, Roca J. Motility characteristics and fertilizing capacity of boar spermatozoa stained with Hoechst 33342. *Reproduction in Domestic Animals* 2002d; 37 (5): 1-6.
 49. Vázquez JM, Martínez EA, Parrilla I, Roca J, Gil MA JL, Vázquez. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted spermatozoa. *Theriogenology* 2003; 59: 1605-14.
 50. Vázquez JM, Martínez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal G, Vázquez JL. Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology* (en prensa), 2004.
 51. Welch GR, Johnson LA. Sex preselection: Laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X – y Y – sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology* 1999; 52: 1343-52.

Lo que Trelacón le hace a la Ileítis



1. Los animales recuperan la capacidad de ingesta

2. Control de la bacteria causante de la enfermedad con lo que se consigue una absorción correcta de los nutrientes, dando lugar a una mayor uniformidad y un flujo de producción óptimo

3. Producción de animales sanos que expresan todo su potencial genético

Trelacón®
La solución a la Ileítis



terneros. **Precauciones particulares durante su uso:** Es estable en los procesos de granulación con temperaturas de preacondicionamiento hasta 75 °C durante el mínimo periodo de tiempo. **Precauciones especiales de conservación:** Conservar en lugar seco, fresco y al abrigo de la luz. Evitar la luz solar directa. **Precauciones Generales:** Uso veterinario. Mantener fuera del alcance de los niños. **Precauciones específicas que deberá tomar la persona que administre el producto al pienso y los operarios de la fabricación de piensos:** Puede causar irritación de la piel. Evitar el contacto directo. Emplear guantes y ropa adecuada cuando se maneje y mezcle Trelacón G 250. Si existe contacto con la piel, lavar las partes afectadas. Si existe contacto con los ojos, lavarse inmediatamente con agua abundante. Si las operaciones de mezcla incluyen riesgo de exposición, usense mascarillas desechables con respirador que sigan el Standard europeo EN 149, o mascarillas con respirador no desechables según el Standard Europeo EN 140 con filtros 143. **Tiempo de espera:** Cerdos: 0 días. **Trelacón G 250 permanece estable en el pienso final durante 1 mes. Para uso exclusivo de fabricantes de piensos y premezclas autorizadas. Dispensación del pienso medicado con receta veterinaria. Número de Autorización de Comercialización:** 1489-ESP. Fabricado por: Eli Lilly and Company Ltd. Speke Operation, Fleming Road, Speke, Liverpool L24 9L LN, Inglaterra.